

# Neue Entwicklungen in der Bioreaktionstechnik

Schügerl, Karl

Veröffentlicht in:  
Jahrbuch 1999 der Braunschweigischen  
Wissenschaftlichen Gesellschaft, S.63-67



J. Cramer Verlag, Braunschweig

KARL SCHÜGERL, Hannover

## Neue Entwicklungen in der Bioreaktionstechnik

Braunschweig, 05.11.1999\*

In den letzten Jahrzehnten haben unsere molekularbiologischen Kenntnisse stark zugenommen. Ihre Anwendung in der industriellen Praxis insbesondere zur Produktion von rekombinanten Proteinen wird oft Gentechnik genannt. Zu ihrer erfolgreichen Nutzung in der Industrie benötigt man mehr Informationen über die Regulation der Mikroorganismen und Zellen, über die Struktur der Produkte und fortgeschrittene Prozessführung, d.h. bessere Messmethoden zur Überwachung der Vorgänge in Bioreaktoren, genauere mathematische Modelle über das Verhalten der Mikroorganismen und Zellen während ihres Wachstums und ihrer Produktbildung, als bisher bei klassischen Verfahren verwendet wurden. Mit Hilfe der verfeinerten Messtechnik und mathematischen Modelle lassen sich die Prozesse besser regeln.

Auch zur Gewinnung und Reinigung der Produkte werden neue Techniken benötigt. Die erforderliche hohe Qualität der Produkte wird mit hochentwickelten analytischen Methoden kontrolliert.

Im Folgenden wird eine Übersicht über die neuen Entwicklungen der Produktbildung, die in Bioreaktoren erfolgt, berichtet. Die Aufarbeitung der Produkte wird nicht behandelt.

### Prozeßüberwachung

In herkömmlichen biotechnologischen Produktionsprozessen werden nur die Temperatur, der pH-Wert und die Abgaszusammensetzung kontinuierlich überwacht. Chemisch spezifische Analysen erfolgen nach dem Abschluß des Prozesses in den analytischen Laboratorien. Die Analysenergebnisse stehen erst nach einigen Tagen seit dem Abschluss des Prozesses zur Verfügung. Daher ist es nicht möglich, die Produktion aufgrund dieser lang andauernden chemischen- biologischen Analysen zu führen.

Zur Regelung werden *in situ* und on-line Analysenverfahren mit sehr kurzen Antwortzeiten benötigt. In den letzten Jahren wurde zunehmend die Fließinjektionsanalyse (FIA) zu nasschemisch-biologischen Reaktionen eingesetzt. Nach einer schnellen Probeentnahme und -vorbereitung wird eine kleine, gut definierte Probemenge in einen kontinuierlich fließenden Trägerstrom, der das Reagens enthält, injiziert. Die gesuchte Verbindung (Analyt) reagiert mit dem Reagens und das gebildete Produkt wird in einem Detektor nachgewiesen. Die Analyse und die Auswertung des Detektorsignals erfolgen innerhalb von wenigen Minuten. Daher kann diese Information zur Prozessregelung verwendet werden.

---

\* Kurzfassung eines Vortrages gehalten in der Klasse für Mathematik und Naturwissenschaften der Braunschweigischen Wissenschaftlichen Gesellschaft

Da die zu bestimmenden Analyten von den begleitenden Komponenten nicht getrennt werden, muss die Detektion hochspezifisch sein. Oft werden Enzym- und Antikörperreaktionen zur Detektion verwendet. Miniaturisierte Biosensoren eignen sich besonders gut zur Detektion, die durch die Reaktion verursachten Änderungen der Temperatur, des pH-Wertes, der Gelöstsauerstoffkonzentration, Farbe usw. in elektrisches Signal umzuwandeln. Mehrkanal-FIA-Systeme wurden zur Überwachung und Regelung der Produktion von Antibiotika, Enzymen und therapeutisch wichtigen Proteine eingesetzt. Spezielle Techniken, wie Nahe-Infrarot-Fourier-Transformations (NIR-FT)-Spektroskopie und zweidimensionale (2D)-Fluoreszenz-Spektroskopie wurden zur *in situ* Prozessüberwachung eingesetzt. Mit diesen Techniken lassen sich die Konzentrationen mehrerer Analyten bestimmen. Dasselbe gilt auch für die HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Sie eignet sich jedoch nicht zur Prozessregelung, da sie nicht schnell genug ist. Sie kann jedoch zur Kontrolle der FIA-Systems verwendet werden.

Oft wird die Zellkonzentration in den Kultivierungsmedien durch die Messung der Lichtabsorption (Optische Dichte, OD) bestimmt, die jedoch durch Feststoffteilchen und Verfärbung des Mediums beeinträchtigt wird. Andere Verfahren verwenden optische, elektrochemische, kalorimetrische, akustische oder fluorometrische Methoden zur on-line Bestimmung der Zellkonzentration. Wenn jedoch nicht nur die Zellzahl, sondern auch die Vitalität der Zellen bestimmt werden soll, müssen mikroskopische Methoden herangezogen werden. Mit Transmissions- oder Direktlicht-Mikroskopie läßt sich die Morphologie und Vitalität der Mikroorganismen und Zellen *in situ* bestimmen. Zur Ermittlung der Morphologie myzelbildender Mikroorganismen wird digitale Bildanalyse eingesetzt und mit aufwendigen Methoden 15 bis 20 charakteristische Größen ermittelt. Die Zahl der morphologischen Parameter, die zur Prozessführung verwendet werden, lässt sich durch ein geeignetes ANN (Artificial Neural Network) reduzieren. Zur Bestimmung der Physiologie der Mikroorganismen lassen sich mehrere off-line Methoden verwenden. Die Lokalisierung der Proteinsynthese erfolgt in den Sporen, Hyphen oder Pellets durch Acridin Orange Färbung der messenger RNA (mRNA) und die Lokalisierung der wachsenden Zellen durch Bromdeoxyuridin-Immuno-Labeling der replikating DNA.

Bei Verwendung von festen Substraten, z.B. Weizenkleie, greifen die Pilzhypen die Samenschale an und bauen sie durch Enzyme (Hydrolasen) ab. Die Lokalisierung der Enzyme im Zytoplasma des Myzels und der Weizenkleie kann man durch Immuno-Goldmarkierung bestimmen. So lässt sich die Bildung der Enzyme im Zytoplasma, ihre Wanderung zur Plasmamembran, ihre Ausscheidung und Anreicherung an den Kontaktstellen der Hyphen mit dem Pilzmyzel sichtbar machen und verfolgen.

### Reaktormodellierung

Zur Kultivierung von Mikroorganismen und Zellen und zur Produktion werden am häufigsten Rührkesselreaktoren verwendet. Es wird angenommen, dass in gut gerührten Laboratoriumsreaktoren ideale Durchmischung vorliegt. Bei kontinuierlicher Prozessführung herrschen in solchen Reaktoren unter stationärem Zustand zeit- und ortsunabhängige Proseßvariablen vor. Die Modellierung dieser Reaktoren ist daher sehr ein-

fach. Auch werden Säulenreaktoren ohne und mit Rückführung verwendet. Die Vorgänge in kleineren Säulenreaktoren lassen sich mit eindimensionalen partiellen Differentialgleichungen beschreiben. Bei größeren Reaktoren müssen die lokalen Heterogenitäten berücksichtigt werden. In einphasigen Rührkesselreaktoren werden die Transportgleichungen, die das momentane Verhalten der Strömung beschreiben, durch das Navier-Stokes-Gleichungssystem und die Kontinuitäts-Gleichung beschreiben. Bei zweiphasiger Strömung wird die Euler-Methode verwendet, die sowohl die kontinuierliche Phase als auch die dispergierte Phase als Kontinuum behandelt (Zwei-Fluid-Modell).

Nach der Euler-Lagrange-Methode wird die kontinuierliche Phase als Kontinuum und die dispergierte Phase als Einzelpartikel behandelt. Die relativen Geschwindigkeiten der Phasen werden aus dem Slip-Modell berechnet. Hierbei werden die Kräfte, die an der Phasengrenze wirken, vernachlässigt. Da in gut durchrührten Rührkesseln Turbulenz vorliegt, kombiniert man die Euler-Methode mit dem  $k$ - $\varepsilon$ -Turbulenz-Modell. Die  $k$ - $\varepsilon$ -Modelle bestehen aus zwei Transportgleichungen: eine für die turbulente kinetische Energie  $k$  und die andere für die Energiedissipationsrate  $\varepsilon$ . Diese Modelle sind in der Lage, auch die Strömungsfelder in unmittelbarer Nähe der rotierenden Rührer zu beschreiben.

Nur für Blasensäulenreaktoren existieren Lösungen mit der Euler-Lagrange-Methode. Durch diese Modelle lassen sich auch die Verteilungen der Phasen und der Gelöstsauerstoff in den Reaktoren ermitteln.

### Stoffwechselmodelle

Die Wechselwirkung zwischen den Zellen und ihrer Umgebung im Reaktor ist entscheidend für den Gesamtprozess. Daher werden neben die fluiddynamischen Vorgänge in Reaktoren auch das Wachstum der Zellen und die Produktbildung mathematisch modelliert. Das klassische Monod-Modell beschreibt das Wachstum nur schlecht. Daher wurden aufwendigere Modelle entwickelt, die Wechselwirkung unterschiedlicher Bereiche der Zellen berücksichtigt (Kompartiment-Modelle). Mit zunehmender Zahl der Bereiche lassen sich die Vorgänge in der Zelle immer besser annähern. Für myzelbildende Mikroorganismen wird die Auskeimung der Hyphen aus den Sporen, ihr Wachstum und ihre Entwicklung z.B. zu Pellets mit aufwendigen Modellen beschrieben.

Der zentrale Stoffwechsel der Mikroorganismen und Zellen und die Biosynthese der Produkte ist recht gut bekannt. Die einzelnen Enzyme wurden aus den Zellen isoliert und ihre Aktivität *in vitro* bestimmt. Die *in vitro* bestimmte Enzymkinetik kann jedoch nur ein qualitatives Bild über die Vorgänge in den Zellen geben. Daher wurde der Stoffwechsel von manchen Zellen mit *in vivo* Kernresonanzspektrometer (NMR)-Messungen bestimmt. Wegen der geringen Empfindlichkeit dieser Methode ist ihre Anwendung beschränkt und wegen ihrer Trägheit der Messungen lassen sich in dieser Weise keine dynamischen Daten gewinnen.

Durch die verbesserte Messtechnik, die Gentechnologie und die großen Computerkapazitäten ist es möglich geworden, den intrazellulären Stoffwechsel zu modellieren. Die intrazelluläre Stoffflussanalyse ist eine auf Messdaten gestützte Methode zur Quantifizierung von Stoffflüssen in einem Stoffwechselabschnitt einer Zelle. Sie ist wesentlicher

Bestandteil von *metabolic engineering*. Drei Methoden werden zur Informationsgewinnung verfolgt: a) Stationäre Stoffflussanalyse (*metabolic flux analysis, MFA*); b) Metabolische Kontrollanalyse (*metabolic control analysis, MCA*); c) Kinetische Modelle von Stoffwechselnetzwerken.

Die stationäre Stoffflussanalyse benutzt ein stöchiometrisches Modell der wichtigsten intrazellulären Reaktionen und Massenbilanzen, um intrazelluläre Stoffflüsse zu schätzen. Dazu werden extrazelluläre Flüsse (Substratsaufnahme-, Produktbildungsrate, Zellzusammensetzung) benutzt. Da die zur Verfügung stehenden Informationen nicht ausreichen, werden Annahmen über den Energiehaushalt der Zelle getroffen. Diese Annahmen entfallen, wenn zusätzliche Messinformationen über  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperimente mit NMR-Messungen vorliegen.

Die metabolische Kontrollanalyse dient zur Identifikation der flusskontrollierenden Reaktionsschritte in einem metabolischen Netzwerk. Hierzu werden *Elastizitätskoeffizienten (EKs)* und *Kontrollkoeffizienten (KKs)* ermittelt. EK beschreibt die differentielle Änderung der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit bei einer differentiellen Änderung der Metabolitkonzentration. Die Anwendung *in vitro* gemessener intrazellulärer Enzymaktivitäten und Metabolitkonzentrationen ist allerdings problematisch. KK beschreibt die differentielle Änderung des stationären Stoffflusses durch einen Stoffwechselweg bei einer differentiellen Änderung der Enzymaktivität.

Kinetische Modelle von Stoffwechselnetzwerken verknüpfen Ergebnisse der stationären Stoffflussanalyse und der metabolischen Kontrollanalyse und können zur Analyse dynamischer Änderungen von Metabolitkonzentrationen eingesetzt werden. Die Identifikation der kinetischen Modellparameter muss mit Hilfe von *in vivo* Konzentrationsabläufen intrazellulärer Metabolite erfolgen. Diese Technik wird z.Zt. entwickelt.

### Prozessregelung

Einige Kontrollvariablen des Reaktors werden mit Fixpunktregelung, PI- oder PID-Regler und einfachem Rückkoppelungskreis auf dem optimalen Wert gehalten. Diese sind die Rührerdrehzahl (PI), die Temperatur (PID), der Gasdruck (PI) und die Strömungsgeschwindigkeit (PI). Bei anderen Kontrollvariablen muss adaptive Regelung verwendet werden. Eine solche Kontrollvariable ist z.B. die Gelöstsauerstoffkonzentration, die bei Anwendung von Antischaummitteln starken Schwankungen unterworfen ist. Manche Prozessvariable, z.B. Zellmassenkonzentration, kann nicht on-line gemessen werden. Daher wird das Messgerät durch einen Beobachter ersetzt, der aus messbaren Daten die Kontrollvariable berechnet und die Rückkoppelung den neuen Bedingungen anpasst.

Bei der gleichzeitigen Verstoffwechselung mehrerer zugeführter Substrate benötigt man eine optimale Strategie zur Regelung der Zufütterung. Dazu wird ein mathematisches Modell benötigt, das die Optimierung der Zufütterungsstrategie ermöglicht. So eine fortgeschrittene Regelung wird z.B. bei der Produktion von Cephalosporin C durch *Acremonium chrysogenum* verwendet, bei der Zucker und Sojaöl als Substrate gleichzeitig verwendet werden. Besonders schwierig ist die optimale Regelung von Bioprozessen, bei denen kaum Messdaten zur Verfügung stehen. So ein Prozess ist die Bierproduktion, bei der in

acht 300 m<sup>3</sup> großen Bioreaktoren nur die Temperatur on-line gemessen wird. Es wurde ein Hybrid Anlagenmodell entwickelt, das die mathematischen Gleichungen der einzelnen Phasen des Wachstums und der Produktbildung sowie die Erfahrungen der Braumeister beinhaltet. Der allmähliche Übergang von einer Phase in die andere, wobei die Phasen mit verschiedenen mathematischen Gleichungen beschrieben werden, erfolgt mit dem Fuzzy-Logic. Die Qualität der Modelle wird während der Produktion mit ANN ständig verbessert. Mit diesem Modell lässt sich die Fermentation optimal fahren und ihre Dauer sehr genau voraussagen, was für die optimale Nutzung der Lagerkapazität wichtig ist. Während der Fermentation steigt die Temperatur. Um die Reaktion in optimalem Temperaturbereich zu halten, muss der Reaktor gekühlt werden. Das kostet jedoch Geld. Da während der Nacht die Stromkosten geringer sind, wird die Fermentation so gefahren, dass tagsüber die Temperatur im Reaktor ansteigt und nachts wird er gekühlt. Dabei dürfen die Abweichungen von der optimalen Temperatur 0.5 C° nicht übersteigen. Mit Hilfe der Hybrid-Modell-Regelung konnten die Kosten der Bierproduktion um 20% reduziert werden.

### Schlussfolgerung

Diese Übersicht zeigt, dass verschiedene Forschungsgruppen in der Bioreaktionstechnik in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt haben.

In den nächsten Jahren werden die dynamischen Methoden zur Stoffflussanalyse verbessert. Die Erstellung kinetischer Modelle von Stoffwechselnetzwerken sowie die Verbesserung der Prozesse durch *metabolic engineering* wird dadurch ermöglicht. Wichtig ist die zukünftige Verbindung der Stoffwechselmodelle mit den Reaktormodellen, um ihre Wechselwirkung quantitativ zu erfassen.

Die Ergebnisse dieser Forschung werden nicht nur unsere Grundlagenkenntnisse verbessern, sondern auch den Wirkungsgrad der Bioprozesse erhöhen und die Produktionskosten reduzieren.

---

Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl  
Institut für Technische Chemie der Universität Hannover  
Callinstraße 3 · D-30167 Hannover